

PCT/JP 2004/012923

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

07.09.2004

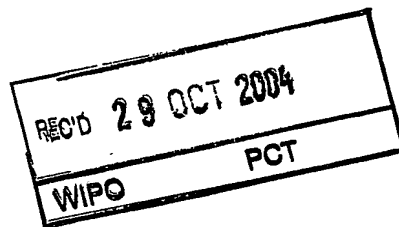
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 4 年 1 月 2 1 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 4 - 0 1 3 2 5 7
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 4 - 0 1 3 2 5 7]

出 願 人 東レ株式会社
Applicant(s):

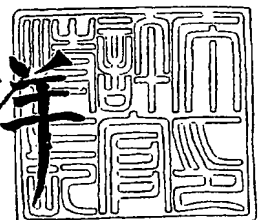


**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 1 0 月 1 5 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川 洋



出証番号 出証特 2 0 0 4 - 3 0 9 2 9 8 5

【書類名】 特許願
【整理番号】 PA04012102
【提出日】 平成16年 1月21日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 C07K 1/36
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号 東レ株式会社 東京事業場内
 【氏名】 内海 潤
【発明者】
 【住所又は居所】 滋賀県大津市園山1丁目1番1号 東レ株式会社 滋賀事業場内
 【氏名】 菅谷 博之
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都渋谷区本町3丁目27番2号 株式会社ディスカバリーハブ・コンサルティング内
 【氏名】 藤田 芳司
【特許出願人】
 【識別番号】 000003159
 【氏名又は名称】 東レ株式会社
 【代表者】 榊原 定征
【代理人】
 【識別番号】 100066865
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 小川 信一
【選任した代理人】
 【識別番号】 100066854
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 野口 賢照
【選任した代理人】
 【識別番号】 100066865
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 斎下 和彦
【先の出願に基づく優先権主張】
 【出願番号】 特願2003-313567
 【出願日】 平成15年 9月 5日
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 002912
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1
 【包括委任状番号】 9806785

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

(I)分子量がアルブミン以上のタンパク質を吸着する工程、(II)分子量がアルブミン以上のタンパク質を分画する工程、(III)タンパク質を濃縮する工程、のうち (I), (II)あるいは (III)から選ばれる工程のうち少なくとも連結された 2 工程から成る生体成分含有水溶液中のタンパク質成分を分離する方法。

【請求項 2】

前記 (I) の工程に、セルロース、セルロースアセテート、ポリカーボネート、ポリスルホン、ポリメタクリレート、ポリアクリレート、ポリアミドナイロン、ポリ弗化ビニリデン、ポリアクリロニトリルからなる群より 1 種類以上選択される素材を含むフィルターもしくは中空糸を用いる請求項 1 に記載の生体成分含有水溶液中のタンパク質成分を分離する方法。

【請求項 3】

前記 (II) の工程に、セルロース、セルロースアセテート、ポリカーボネート、ポリスルホン、ポリメタクリレート、ポリアクリレート、ポリアミドナイロン、ポリ弗化ビニリデン、ポリアクリロニトリル、ポリエステル、ポリウレタン、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレンからなる群より 1 種類以上選択される素材を含むフィルターもしくは中空糸を用いる請求項 1 に記載の生体成分含有水溶液中のタンパク質成分を分離する方法。

【請求項 4】

前記 (III) の工程に、セルロース、セルロースアセテート、ポリカーボネート、ポリスルホン、ポリメタクリレート、ポリアクリレート、ポリアミドナイロン、ポリ弗化ビニリデン、ポリアクリロニトリルからなる群より 1 種類以上選択される素材を含むフィルターもしくは中空糸を用いる請求項 1 に記載の生体成分含有水溶液中のタンパク質成分を分離する方法。

【請求項 5】

ポリエチレンジイミン、アミノメチルピリジン、ポリフェノール、ブルー色素、2 価金属イオン、疎水性化合物からなる群より 1 種類以上選択される物質が固定化された素材を (I) の工程または／および (II) の工程に用いる請求項 2 から 4 のいずれかに記載の生体成分含有水溶液中のタンパク質成分を分離する方法。

【請求項 6】

界面活性剤、乳化剤、有機溶媒、アルコール、エチレングルコール、ポリプロピレングリコール、ポリエチレンジイミン、アミノメチルピリジン、硫酸プロタミン、硫酸アンモニウム、ポリフェノール、ブルー色素、カオトロピック塩、疎水性化合物からなる群より 1 種類以上選択される物質を (I) の工程または／および (II) の工程に用いることを特徴とする請求項 2 から 5 のいずれかに記載の生体成分含有水溶液中のタンパク質成分を分離する方法。

【請求項 7】

生体由来成分の検体が生体成分含有水溶液として用いられることを特徴とする請求項 1 ～ 6 のいずれかに記載の生体成分含有水溶液中のタンパク質成分を分離する方法。

【請求項 8】

ヒト由来成分の検体が生体成分含有水溶液として用いられることを特徴とする請求項 1 ～ 6 のいずれかに記載の生体成分含有水溶液中のタンパク質成分を分離する方法。

【請求項 9】

請求項 1 に記載の生体成分含有水溶液中のタンパク質成分を分離する方法を用いるタンパク質分画装置であって、組み合わされた各工程が、水溶液流路によって直結され、連続して稼動できることを特徴とするタンパク質分画装置。

【請求項 10】

液体クロマトグラフ、電気泳動または／および質量分析装置に連結して稼動できることを特徴とする請求項 9 に記載のタンパク質分画装置。

【請求項 11】

生体由来成分の検体が生体成分含有水溶液として用いられることを特徴とする請求項 9 または 1 0 に記載のタンパク質分画装置。

【請求項 1 2】

ヒト由来成分の検体が生体成分含有水溶液として用いられることを特徴とする請求項 9 または 1 0 に記載のタンパク質分画装置。

【書類名】明細書

【発明の名称】生体成分含有水溶液中のタンパク質成分を分離する方法およびタンパク質分画装置

【技術分野】

【0001】

本発明は生体成分含有水溶液、特にヒトの血漿、尿等からの生体分子（タンパク質成分）の分離に関する。

【背景技術】

【0002】

近年、ポストゲノム研究として、プロテオーム解析研究（プロテオミクス）が注目され始めた。遺伝子産物であるタンパク質は遺伝子よりも疾患の病態に直接リンクしていると考えられることから、タンパク質を網羅的に調べるプロテオーム解析の研究成果は診断と治療に広く応用できると期待されている。しかも、ゲノム解析では発見できなかった病因タンパク質や疾患関連因子を多く発見できる可能性が高い。

【0003】

プロテオーム解析の急速に進展しだしたのは、技術的には質量分析装置（mass spectrometer: MS）による高速構造分析が可能となってきたことが大きく、MALDI-TOF-MS（matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry）等の実用化によって、ポリペプチドのハイスルースルー超微量分析が可能となり、従来検出し得なかった微量タンパク質までが同定可能となり、疾患関連因子の探索に強力なツールとなってきた。

【0004】

プロテオーム解析の臨床応用の第一目的は、疾患によって誘導あるいは消失するバイオマーカータンパク質の発見である。バイオマーカーは、病態に関連して挙動するため、診断のマーカーとなり得るほか、創薬ターゲットとなる可能性も高い。すなわち、プロテオーム解析の成果は、特定遺伝子よりも診断マーカーや創薬ターゲットとなる可能性が高いため、ポストゲノム時代の診断と治療の切り札（エビデンス）技術となり、同定されたバイオマーカーは患者の薬剤応答性評価や副作用発現予測という直接的に患者が享受しえる利益につながることから、いわゆるテーラーメイド医療（オーダーメイド医療）の推進に大きな役割を果たすといえる。

【0005】

臨床研究にプロテオーム解析（臨床プロテオミクス）を導入する場合には、大量の検体を迅速、確実に解析することが求められており、しかも臨床検体は微量で貴重なために高分解能・高感度・高機能測定を迅速に行う必要がある。この大きな推進力となったのは質量分析（mass spectrometry）であり、質量分析装置のもつ超高感度でハイスルースルーの特性の貢献するところが大きい。しかしながら、その手法や機器が急速に改良されてきているものの、プロテオーム解析が臨床現場で簡便かつ迅速に実施できる状況には、まだない。

【0006】

その原因のひとつに臨床検体の前処理が挙げられる。質量分析にかける前の処理として臨床検体のタンパク質を分画し精製することが必要で、この処理にはまだ数日かかるのが実態であり、さらに前処理の操作が煩雑で経験も必要とされることが、臨床への応用の大きな障害となっている。少量の血液や体液から全身の疾患の診断や病態管理ができれば、その有用性は極めて大きいものの、血漿中に含まれるタンパク質の多様性のために、多くの課題を生じている。

【0007】

ヒト・タンパク質は10万種以上とも推定されているが、血清中に含まれるタンパク質だけでも約1万種類にものぼるといわれ、総量としての血清中濃度は約60～80mg/mLである。血清中の高含量のタンパク質は、アルブミン（分子量66kDa）、免疫グロブリン（150～190kDa）、トランスフェリン（80kDa）、ハプトグロビン（>85kDa）、リポタンパク質（数100kDa）等

であり、いずれも大量(>mg/mL)に存在する。一方、病態のバイオマーカーや病因関連因子と考えられているペプチドホルモン、インターロイキン、サイトカイン等の生理活性タンパク質の多くは、極微量(<ng/mL)にしか存在せず。その含有量比は高分子の高含量成分に比べて、実にnanoからpicoレベルである。タンパク質の大きさという点では、タンパク質全種類の70%以下は分子量60kDa以下であり、上記の極微量なバイオマーカータンパク質はいずれもこの領域に含まれる場合がほとんどである(例えば非特許文献1)。これらのタンパク質は腎臓を通過して尿中に一部排泄されるため、血液のみならず尿を検体として測定することも可能である。

【0008】

一般的な血清学的検査でプロテオーム解析するには、病因関連の微量成分検出の妨害となる分子量6万以上の高分子成分を除外することがまず必須となる。

【0009】

この高分子量タンパク質の分離手段として、現状では高速液体クロマトグラフィー(liquid chromatography: LC)や二次元電気泳動(2 dimensional-polyacrylamide gel electrophoresis: 2D-PAGE)が用いられているが、LCや2D-PAGEの作業だけでも1~2日を要している。この所要時間は、MALDI-TOF-MSやESI-MS(electrospray ionization mass spectrometry)等の数分という分析時間に比べて非常に長く、MSのもつハイスループットという大きな利点が臨床プロテオーム解析では十分発揮できずにいる。このため、医療現場で診断や治療のためにできるだけ短時間に分析結果がほしいという目的には、現時点では実用性に極めて乏しいといわざるを得ず、日常の臨床検査にMSが利用しにくいひとつの大きな原因になっている。

【0010】

この点が解決されると、臨床プロテオーム解析による臨床検査の診断の迅速性は飛躍的に向上すると期待できる。具体的には、LCや2D-PAGEの代替となるような、微量の検体で高速に目的タンパク質群を分画・分離できるデバイスがあればよい。

【0011】

アルブミンを主な対象物質として、すでに実用化されている製品あるいは開示されている技術としては、ブルー色素などのアフィニティーリガンドを固定化した担体(たとえば、日本ミリポア社: "Montage Albumin Deplete Kit"、日本バイオ・ラッド社: AffiGel Blueゲル)、高分子量成分を遠心分離過程によって分画する遠心管形式の装置(たとえば、日本ミリポア社: "アミコンウルトラ")、電気泳動原理によって分画する方法(たとえば、グラディポア社: "Gradiflow" システム)、Cohnのエタノール沈澱などの伝統的な沈澱法やクロマトグラフィーによって分画する方法(例えば非特許文献2)などがある。

【0012】

しかしこれらは、いずれも分離分画性能が十分ではなかったり、微量サンプルには不適當であったり、サンプルが希釈されてしまったり、あるいは質量分析等に障害となる薬剤が混入したりするなどの問題点がある。

【0013】

これらを解決する方法や装置の開発により、医学研究ならびに臨床現場でプロテオーム解析が広く行われるようになり、より迅速で高精度な検査や診断が可能となって、有用な治療法がない難治性の疾患の原因究明や早期の診断法の開発には強力なツールとなると期待できる。

【非特許文献1】 アンダーソン・NL (Anderson NL), アンダーソン・NG (Anderson NG) 著, 「ザ・ヒューマン・プラズマ・プロテオーム: ヒストリー・キャラクター・アンド・ダイアグノスティック・プロスペクツ (The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects)」, モレキュラー・アンド・セルラー・プロテオミクス (Molecular & Cellular Proteomics), (米国), ザ・アメリカン・ソサエティー・フォー・バイオケミストリー・アンド・モレキュラー・バイオロジー・インコーポレーテッド (The American Society for Biochemistry and Molecular B

iology, Inc.), 2002年, 第1巻, p845-867.

【非特許文献2】日本生化学会編, 「新生化学実験講座 (第1巻) タンパク質(1) 分離・精製・性質」, 東京化学同人, 1990年

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

上述のとおり、臨床プロテオーム解析をする際に、妨害となる過剰な高分子量のタンパク質を除去することが必要である。2D-PAGEや液体クロマトグラフィーなどの高分離能ではあるが、煩雑で時間がかかる手法よりも、簡便で短時間に高い分離能を有するデバイスが求められている。

【0015】

極最近でも、Affi-Gel Blueゲルを用いた方法 (N. Ahmed et al., Proteomics, On-line版, 2003/06/23) や “Gradiflow” システムを用いた方法 (D. L. Rothmund et al. (2003), Proteomics, vol. 3, pp279-287) などが有効な改良されたアルブミン除去法として発表されているままで、新たに簡便にして高分離能を有する手法は報告されていない。

【0016】

血漿中からのアルブミンの除去を指標として、求められる手法の条件としては、血漿成分を高速で流せること、タンパク質変性作用がないこと、高機能化のための微細加工がされていること、著しく高価でないこと等である。これらの課題を解決する装置やデバイスは、まだ見当たらず、本発明が解決しようとする課題である。

【0017】

したがって、本発明の目的は、臨床プロテオーム解析をする際に妨害となる余分な高分子量のタンパク質を生体成分含有水溶液から有利に分離する方法およびその方法を行うためのタンパク質分画装置を提供することである。本発明によって得られる処理液 (分析検体) は臨床プロテオーム解析に有用である。

【課題を解決するための手段】

【0018】

本発明に係る生体成分含有水溶液中のタンパク質成分を分離する方法およびタンパク質分画装置は以下のような構成をとる。

(1) (I) 分子量がアルブミン以上のタンパク質を吸着する工程、(II) 分子量がアルブミン以上のタンパク質を分画する工程、(III) タンパク質を濃縮する工程、のうち (I), (II) あるいは (III) から選ばれる工程のうち少なくとも連結された2工程から成る生体成分含有水溶液中のタンパク質成分を分離する方法。

(2) 前記 (I) の工程に、セルロース、セルロースアセテート、ポリカーボネート、ポリスルホン、ポリメタクリレート、ポリアクリレート、ポリアミドナイロン、ポリ弗化ビニリデン、ポリアクリロニトリル、ポリエステル、ポリウレタン、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレンからなる群より1種類以上選択される素材を含むフィルターもしくは中空糸を用いる (1) に記載の生体成分含有水溶液中のタンパク質成分を分離する方法。

(3) 前記 (II) の工程に、セルロース、セルロースアセテート、ポリカーボネート、ポリスルホン、ポリメタクリレート、ポリアクリレート、ポリアミドナイロン、ポリ弗化ビニリデン、ポリアクリロニトリル、ポリエステル、ポリウレタン、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレンからなる群より1種類以上選択される素材を含むフィルターもしくは中空糸を用いる (1) に記載の生体成分含有水溶液中のタンパク質成分を分離する方法。

(4) 前記 (III) の工程に、セルロース、セルロースアセテート、ポリカーボネート、ポリスルホン、ポリメタクリレート、ポリアクリレート、ポリアミドナイロン、ポリ弗化ビニリデン、ポリアクリロニトリル、ポリエステル、ポリウレタン、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレンからなる群より1種類以上選択される素材を含むフィルターもしくは中空糸を用いる (1) に記載の生体成分含有水溶液中のタンパク質成分を分離す

る方法。

(5) ポリエチレンイミン、アミノメチルピリジン、ポリフェノール、ブルー色素、2価金属イオン、疎水性化合物からなる群より1種類以上選択される物質が固定化された素材を(I)の工程または／および(II)の工程に用いる(2)から(4)のいずれかに記載の生体成分含有水溶液中のタンパク質成分を分離する方法。

(6) 界面活性剤、乳化剤、有機溶媒、アルコール、エチレングルコール、ポリプロピレングリコール、ポリエチレンイミン、アミノメチルピリジン、硫酸プロタミン、硫酸アンモニウム、ポリフェノール、ブルー色素、カオトロピック塩、疎水性化合物からなる群より1種類以上選択される物質を(I)の工程または／および(II)の工程に用いることを特徴とする(2)から(5)のいずれかに記載の生体成分含有水溶液中のタンパク質成分を分離する方法。

(7) 生体由来成分の検体が生体成分含有水溶液として用いられることを特徴とする(1)～(6)のいずれかに記載の生体成分含有水溶液中のタンパク質成分を分離する方法。

(8) ヒト由来成分の検体が生体成分含有水溶液として用いられることを特徴とする(1)～(6)のいずれかに記載の生体成分含有水溶液中のタンパク質成分を分離する方法。

(9) (1)に記載の生体成分含有水溶液中のタンパク質成分を分離する方法を用いるタンパク質分画装置であって、組み合わされた各工程が、水溶液流路によって直結され、連続して稼動できることを特徴とするタンパク質分画装置。

(10) 液体クロマトグラフ、電気泳動または／および質量分析装置に連結して稼動できることを特徴とする(9)に記載のタンパク質分画装置。

(11) 生体由来成分の検体が生体成分含有水溶液として用いられることを特徴とする(9)または(10)に記載のタンパク質分画装置。

(12) ヒト由来成分の検体が生体成分含有水溶液として用いられることを特徴とする(9)または(10)に記載のタンパク質分画装置。

【発明の効果】

【0019】

本発明における以上の手法によって、特に血漿をはじめとする生体成分含有水溶液からアルブミン等の高分子量タンパク質を簡便かつ効率よく分画することができる。

【0020】

本発明によれば、分画・吸着・濃縮の3つの工程のうち少なくとも連結された2工程から成る工程によって効率的に目的とするタンパク質成分を分離することができる。さらに、セルロース、セルロースアセテート、ポリカーボネート、ポリスルホン、ポリメタクリレート、ポリアクリレート、ポリアミドナイロン、ポリ弗化ビニリデン、ポリアクリロニトリル、ポリエステル、ポリウレタン、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレンのいずれかひとつの素材からなるフィルターあるいは中空糸を用いることにより一層効率的に目的とするタンパク質成分を分離することができる。これらのフィルターあるいは中空糸に、ポリエチレンイミン、アミノメチルピリジン、ポリフェノール、ブルー色素、2価金属イオン、疎水性化合物のうち、少なくともいずれかひとつをリガンドとして固定化することにより、フィルターあるいは中空糸にタンパク質への親和性を付与し、アルブミンをはじめとする不要なタンパク質を吸着除去する機能を付与することができる。用いる移動相の水溶液には、界面活性剤、乳化剤、有機溶媒、アルコール、エチレングルコール、ポリプロピレングリコール、ポリエチレンイミン、アミノメチルピリジン、硫酸プロタミン、硫酸アンモニウム、ポリフェノール、ブルー色素、カオトロピック塩、疎水性化合物のうち、少なくともいずれかひとつを含むことにより、最終的な分離性能を向上させることができる。

上記のリガンドの選択ならびに水溶液溶質の選択は、目的とするタンパク質群の分離の程度を勘案しながら行うことができる。

【0021】

分画性能は、材料中のタンパク質組成にもよるが、健康成人の血漿の場合、本デバイス1回の操作で、分子量50kDa以上の高分子量タンパク質の除去率90%以上、分子量50kDa未満のタンパク質の平均回収率70%以上、分子量50kDa未満のタンパク質の平均濃縮率10倍以上の効果が得られる。

【0022】

また、所要時間としては、1回の処理時間が1～6時間以内で、検体のコンタミネーションおよびバイオハザードの防止の点から、一連のデバイスは一回使用とする。電気泳動システムや液体クロマトグラフィーを用いる分析では、機器を再使用して用いるため、検体による汚染の危険性や再生した分析カラムによる再現性への影響などが問題となることがあり、操作の煩雑さも含めて必ずしも多数の検体の頻回処理には向いていない。本発明になるタンパク質分画デバイスはディスポーザブル仕様であり、検体からの汚染の回避や分析の再現性の確保の点からも大きな利点である。

【0023】

このようにして得られた分析検体は、液体クロマトグラフ、電気泳動、MS等の各種のタンパク質分析に有用であるが、特に好ましくはMSを用いたプロテオーム解析に有用である。

【0024】

本装置のあとに直接あるいは間接的に適用できるMSは特に限定されないが、好ましくは、イオン化部分として、電子スプレーイオン化型、大気圧イオン化型、高速原子衝突型、四重極型、サイクロトロン共鳴型、磁気セクター型、マトリックス支援レーザー破壊イオン化型などが、イオン補足型、飛行時間型、フーリエ変換型などの質量分析部と適宜組み合わせられて用いられる。この場合、MS/MS、MS_nなどのタンデムMSやFT-MSとして用いることもできる。タンデムMSの場合は、全てのタイプのMSが適用可能であるが、特にイオン捕捉型、四重極-飛行時間 (Q-TOF) 型、FT-MSなどの組合せで使用することが効率がよい。

【0025】

本装置との組み合わせによる分析により、各種微量タンパク質成分の構造情報を集めることができるが、それらはペプチド・マスフィンガープリント (peptide-mass fingerprint: PMF) のみならず、各ペプチドの一次構造情報 (アミノ酸配列) も含まれる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0026】

本発明は、生体成分含有水溶液中のタンパク質成分を分離する方法であって、(I) 分子量がアルブミン以上のタンパク質を吸着する工程、(II) 分子量がアルブミン以上のタンパク質を分画する工程、(III) タンパク質を濃縮する工程、のうち少なくとも連結された2工程から成り、工程にセルロース、セルロースアセテート、ポリカーボネート、ポリスルホン、ポリメタクリレート、ポリアクリレート、ポリアミドナイロン、ポリ弗化ビニリデン、ポリアクリロニトリル、ポリエステル、ポリウレタン、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレンのいずれかひとつの素材からなるフィルターあるいは中空糸を用いる方法ならびにその装置である。

【0027】

平面フィルター、カートリッジ式フィルター等の平膜型分離膜 (フィルター)、中空糸等の中空状分離膜 (中空糸) のいずれも用いることができるが、一般に、中空糸は処理液量あたりの表面積が大きく、圧損も少ないため、分画・吸着・濃縮の工程に最も効率よく用いることができる。また、平面フィルターは製膜が容易で安価に作成することができるという利点がある。

【0028】

本発明でいう「分離」とは回収目的のタンパク質と廃棄目的のタンパク質を弁別することをいう。また、本発明でいうアルブミンとはヒト、ウシ、その他哺乳動物及び鳥類由来のアルブミンのことをいう。分子量がアルブミン以上のタンパク質とは、主にアルブミン (分子量6～7万) より高分子量のタンパク質のことをいう。アルブミンより高分子量であるか否かはSDS-PAGE (sodiumdodecylsulphate-polyacrylamide gel electrophoresis:

ドデシル硫酸ナトリウムを含むポリアクリルアミドゲル電気泳動) という方法により判別可能である。

【0029】

主なタンパク質を分離・分画する手法は、濃度差による凝集沈殿法、分子篩い効果、イオンの相互作用、疎水的相互作用、水素結合、アフィニティーによる特異的結合などを利用したクロマトグラフィー、さらに電気泳動などが挙げられる。分離能を上げるためには、一般的には単一の手法では難しく、通常、複数の分離モードを利用して達成される。たとえば、陽イオンクロマトグラフィーと逆相液体クロマトグラフィーの組み合わせや、ゲルろ過とアフィニティークロマトグラフィーの組み合わせ、逆相液体クロマトグラフィーとSDS-PAGEの組み合わせなどである。これらは、微量分析的に、あるいは大量の調製のために行われるが、いずれの場合も精製原料から出発して数日から数週間を要するのが一般的である。ただし、単独工程の手法が効果的な場合で、たとえば、特定の分子量領域を分画するために分子篩いの効果を十分に求める場合や疎水的なタンパク質を効率的に分離するために疎水的分離作用を十分に求める場合、あるいはイオンの相互作用を重ねて利用して分離を行う場合には、同一工程が数回繰り返して用いられる。ここでいう同一工程とは、同一種の処理膜を使用する場合のみならず、同様な処理機能を有する工程を指す。一方、異なる工程の手法が効果的な場合で、イオンの相互作用と疎水的相互作用の組み合わせや、分子篩い作用と疎水的相互作用の組み合わせ、あるいは分子篩い作用とイオンの相互作用の組み合わせ、さらには分子篩い作用とイオンの相互作用と疎水的相互作用の3つの工程の組み合わせなど、分離・分画するタンパク質の特性と目的に合わせて適宜好ましい手法が用いられる。

【0030】

本発明者らは、上記の様々な手法を利用し、特にMS分析には、より短時間でMS分析に連結可能なレベルまでに分離・分画する手法が求められることに着眼し、新たなタンパク質の分離・分画方法として本発明を完成した。

【0031】

本発明における吸着、分画、濃縮の各工程は、タンパク質の分離精製モードとしては一般的ではあるが、各工程に適切なフィルターあるいは中空糸モジュールを配置し、これらを連結することによって、簡便なタンパク質の分離・分画デバイスを完成した。

【0032】

本発明では特に中空糸モジュールが特徴となる。中空糸はタンパク質関係では従来より人工腎臓(透析モジュール)として多く利用されているが、いずれもアルブミン等のタンパク質を漏出させないように保持され、クレアチニンや尿素などの低分子成分を漏出させて中空糸内腔側を流れる血液を浄化する目的で使用される。一方、本発明においては、中空糸内腔側から漏出する画分を分析のために収集する方法で用い、中空糸内腔側にはアルブミン等の高分子量成分を保持しながら、主に分子量5kDa以下のタンパク質成分を漏出させる方法を取る。このような、目的と手法で中空糸を分離・分画デバイスとして用いるのは、本発明で初めて達成された。特に中空糸は表面積が大きく、操作上の圧損が少ないため、効率よく本発明を実施することができる。

本発明のデバイスの概念図は後記の図1のとおりであり、実際の構成は以下のとおりである。

(1) 吸着工程

「吸着工程」とは生体成分含有水溶液中のアルブミン以上の分子量のタンパク質を吸着する工程を意味する。ここでいう「吸着」とは水溶液中に可溶化しているタンパク質が膜との相互作用により捕捉されることをいう。本工程では、平面フィルターあるいは中空糸モジュールの膜に疎水的性質を保有させ、アルブミンをはじめとする疎水的なタンパク質を吸着させることを指す。

【0033】

本発明で用いる膜の素材は特に限定しないが、セルロース、セルローストリアセテート等のセルロースアセテート系ポリマー、ポリカーボネート、ポリスルホンやポリエーテル

スルホンなどのポリスルホン系ポリマー、ポリメチルメタクリレート等のポリメタクリレート、ポリアクリレート、ポリアミドナイロン、ポリ弗化ビニリデン、ポリアクリロニトリル、ポリエステル、ポリウレタン、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレンのいずれかひとつの素材の高分子が使用される。この中でも近年透析器などに良く用いられているポリスルホンは分画特性が良好であるために好ましい素材である。膜構造に関しては、均一構造に近いスポンジ構造を有するものや、緻密層と空隙率が高く膜強度を維持する支持層の二層構造からなるもののいずれも用いることができる。

【0034】

また素材形態としては、球状ビーズ、繊維等の形態、繊維を編地、不織布、ステーブルを用いた平面状の形態、中空糸の形態などが挙げられ、それぞれに表面の凹凸が大きい多孔体形状であることが吸着表面積を増大させる効果のために好ましい。また、平膜や中空糸膜等の分離膜の形態であれば、分離と吸着を同時に達成できるため、特に好ましい。

【0035】

膜基材自体の特性としては、比選択的タンパク質吸着を抑えるために親水性化されたものや、アルブミン等の高分子量タンパク質を選択的に吸着するために疎水性化されたものが、分画と吸着の各工程に応じて、適宜選択されて使用される。

【0036】

親水性膜では、親水性の単量体と疎水性の単量体を共重合させたものや、親水性の高分子と疎水性の高分子をブレンド製膜したもの、あるいは疎水性の高分子からなる膜の表面に親水性ポリマーを結合、付着させたもの、疎水性の高分子からなる膜の表面を化学処理、プラズマ処理、放射線処理したものなどがあげられるが、親水化されていればその方法は特に限定されない。親水性成分は特に限定しないが、ポリエチレングリコールなどのポリアルキレンオキサイド、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、ポリヒドロキシエチルメタクリレートなどの親水性高分子が好ましい。疎水性膜では、疎水性成分を混入させたり、疎水性リガンドを膜表面に導入したものが用いられる。疎水性成分としてはメタクリル酸エステル、アクリル酸エステル、エチレン、プロピレン等のオレフィン、アクリロニトリル、メタクリロニトリル等の炭素-炭素二重結合を有する付加重合性化合物からなる重合体や、ポリスルホン、セルロースなどの重合体を例示することができるが、膜素材として用いることができるものであれば特に限定されるものではない。

【0037】

さらには、ポリエチレンイミン、アミノメチルピリジン、ポリフェノール、ブルー色素、2価金属イオン、疎水性芳香族化合物等のうち、少なくともいずれかひとつ以上を固定化した素材を用いることもできる。

【0038】

膜の分子分画性能に関しては、生理的食塩水中でアルブミンを通過させない程度の分子分画能（カットオフ値：30～50kDa以下）を用いる。

【0039】

(2) 分画工程

「分画工程」とは生体成分含有水溶液中のアルブミン以上の分子量のタンパク質を分画する工程を意味する。ここでいう「分画」とは分子量によりタンパク質を弁別することをいう。本工程では、平面フィルターあるいは中空糸モジュールの膜に分子篩い効果を有する多孔性膜を用い、分離ふるいによる分子分画を行う。特に中空糸を用いることが分画膜表面積が極めて大きくなるため、有効である。

【0040】

本発明で用いる膜の素材は特に限定しないが、セルロース、セルローストリアセテート等のセルロースアセテート系ポリマー、ポリカーボネート、ポリスルホンやポリエーテルスルホンなどのポリスルホン系ポリマー、ポリメチルメタクリレート等のポリメタクリレート、ポリアクリレート、ポリアミドナイロン、ポリ弗化ビニリデン、ポリアクリロニトリル、ポリエステル、ポリウレタン、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレンのいずれかひとつの素材の高分子が使用される。この中でも近年透析器などに良く用いられて

いるポリスルホンは分画特性が良好であるために好ましい素材である。膜構造に関しては、均一構造に近いスポンジ構造を有するものや、緻密層と空隙率が高く膜強度を維持する支持層の二層構造からなるもののいずれも用いることができる。

【0041】

親水性膜では、親水性の単量体と疎水性の単量体を共重合させたものや、親水性の高分子と疎水性の高分子をブレンド製膜したもの、あるいは疎水性の高分子からなる膜の表面に親水性ポリマーを結合、付着させたもの、疎水性の高分子からなる膜の表面を化学処理、プラズマ処理、放射線処理したものなどがあげられるが、親水化されていればその方法は特に限定されない。親水性成分は特に限定しないが、ポリエチレングリコールなどのポリアルキレンオキサイド、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、ポリヒドロキシエチルメタクリレートなどの親水性高分子が好ましい。これらの親水性膜は必要とするタンパク質の吸着を抑え、無駄なく回収する効果がある。疎水性膜では、疎水性成分を混入させたり、疎水性リガンドを膜表面に導入したものが用いられる。疎水性成分としてはメタクリル酸エステル、アクリル酸エステル、エチレン、プロピレン等のオレフィン、アクリロニトリル、メタクリロニトリル、ポリ沸化ビニリデン等の炭素-炭素二重結合を有する付加重合性化合物からなる重合体や、ポリスルホン、セルロースなどの重合体を例示することができるが、膜素材として用いることができるものであれば特に限定されるものではない。

【0042】

さらには、ポリエチレンジイミン、アミノメチルピリジン、ポリフェノール、ブルー色素、2価金属イオン (Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} 等)、疎水性化合物 (メチル基、ベンジル基、フェニル基、クロロメチル基、オクチル基、ラウリル基等) などのうち、少なくともいずれかひとつ以上を固定化した素材を用いることもできる。

【0043】

膜の分子分画性能に関しては、生理的食塩水中でアルブミンを通過させない程度の分子分画能 (カットオフ値: 30~50kDa以下) を用いる。

【0044】

吸着工程と分画工程では、展開する緩衝液中に、各種の薬剤を加えて、吸着あるいは分画性能を向上させることができる。具体的には、工程に用いる水溶液中に、界面活性剤、乳化剤、有機溶媒、アルコール、エチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリエチレンジイミン、アミノメチルピリジン、硫酸プロタミン、硫酸アンモニウム、ポリフェノール、ブルー色素、カオトロピック塩、疎水性化合物のうち、少なくともいずれかひとつを含むことを特徴とする。

【0045】

たとえば、アルブミンの凝集を促進させる硫酸アンモニウム、ポリエチレングリコール、ポリエチレンジイミン、カオトロピック塩等を適宜加えることにより、高分子成分のタンパク質の凝集による巨大分子化を促進し、吸着の促進や分画膜からの漏出を抑制し、高分子成分を効率的にカットオフすることができる。一方、分画工程では、界面活性剤 (両性界面活性剤や陰イオン性海面活性剤等) を適宜加えることにより、タンパク質間の相互作用を抑制し、分子分画を効率的に行うことができる。

【0046】

(3) 濃縮工程

「濃縮工程」とは生体成分含有水溶液中のタンパク質を濃縮する工程を意味する。ここでいう「濃縮」とは水溶液中から水及び分子量1kDa以下の低分子成分を除去し、残液中のポリペプチド部分が濃縮されることをいう。本工程では、平面フィルターあるいは中空糸モジュールの膜に分子篩い効果を有する多孔性膜を用い、分離ふるいによる濃縮を行う。サンプルが少量の場合には、遠心型のチューブに平面フィルターを貼り付けた濃縮デバイスを、大量のサンプルの場合には、中空糸を用いることが有効である。

【0047】

本発明で用いる膜の素材は特に限定しないが、セルロース、セルローストリアセテート

等のセルロースアセテート系ポリマー、ポリカーボネート、ポリスルホンやポリエーテルスルホンなどのポリスルホン系ポリマー、ポリメチルメタクリレート等のポリメタクリレート、ポリアクリレート、ポリアミドナイロン、ポリ弗化ビニリデン、ポリアクリロニトリル、ポリエステル、ポリウレタン、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレンのいずれかひとつの素材の高分子が使用される。この中でも近年透析器などに良く用いられているポリスルホンは分画特性が良好であるために好ましい素材である。膜構造に関しては、均一構造に近いスポンジ構造を有するものや、緻密層と空隙率が高く膜強度を維持する支持層の二層構造からなるもののいずれも用いることができる。

【0048】

膜の分子分画性能に関しては、生理的食塩水中でペプチドを通過させない程度の分子分画能（カットオフ値：0.01~0.5kDa以下）を有する膜が限外ろ過膜を用いる。

（4）全体の構成ならびに運転条件

複数の各工程は水溶液流路で直結され、連続して稼働することによって、簡便かつ自動的に連続運転できるという効果が得られるが、必要により、各工程を独立して稼働させてもよい。チューブにはポンプが装着され、ポンプにより送液されるが、小規模の場合にはシリンジによる送液、遠心チューブ型装置による濃縮では、遠心操作で行っても構わない。また、本発明のいう「組み合わせられた各工程が、水溶液流路によって直結され、連続して稼働できる」とは、複数の工程が水溶液流路で結ばれた複数の装置で行われていることを意味し、単独で複数の工程を行う装置を複数個水溶液流路によって直結される態様も含む。すなわち、アルブミン以上の分子量のタンパク質を吸着する工程とアルブミン以上の分子量のタンパク質を分画する工程を同時に行う第一の中空糸モジュールと、アルブミン以上の分子量のタンパク質を分画する工程とタンパク質を濃縮する工程を同時に行う第二の中空糸モジュールが水溶液流路で直結されているような態様も含まれる。

【0049】

上記の（1）～（3）は同一工程の繰り返し、あるいは異なる2つの工程を組み合わせることによって、より優れた効果を得ることができる。同一工程の繰り返し、あるいは異なる2つの工程を用いることの判断は、初段に適用する材料の含まれるタンパク質の組成の程度によって判断される。

【0050】

本発明は生体成分含有水溶液、特にヒトの血漿、尿、唾液、涙液、脳脊髄液、腹水、胸水等のからの生体分子（タンパク質成分）の分離に適する。上記の各フィルターならびに中空糸モジュールのサイズならびに還流液の流速は、原料とする血漿や尿等の生体材料の質と量に依存して適宜決められるが、いわゆる卓上サイズで実施する場合、血漿では1~400mL好ましくは5~100mLで実施され、流速は1~20mL/min好ましくは2~10mL/minで行われる。

【0051】

以下、本発明の生体成分含有水溶液中のタンパク質成分を分離する方法およびタンパク質分画装置の一態様例につき、図を用いながら説明する。

【0052】

図1は、本発明のタンパク質分画装置の概念図（吸着、分画、濃縮の3工程の例）である。液の流れを矢印で示してある。血清などの材料の検体はバルブ1から第1工程のモジュール5に注入され、溶液循環回路（チューブ）2の中をポンプ3によって送液せられ、循環する。第1工程で処理された回収液は、回収口4から得られる。この態様が1工程の単位であり、2工程では2段の繰り返し、3工程では3段繰り返すことになる。図1は3段の例を示しており、第2工程のモジュール6と第3工程のモジュール7が連結されている。処理された回収液は、回収口に直結されたチューブによって次工程のモジュールに注入される。分画と吸着工程の場合の処理液は回収口から、濃縮工程の場合の処理液は工程のモジュール内から回収される。

【実施例】

【0053】

(実施例 1)

ポリスルホン中空糸100本を束ね、中空糸中空部を閉塞しないようにエポキシ系ポッティング剤で両末端をガラス管モジュールケースに固定し、ミニモジュールを作成した。該ミニモジュールの直径は約7mm、長さは約17cmであり、一般的な中空糸膜型透析器同様に透析液ポートを2個有している。該ミニモジュールの中空糸およびモジュール内部を蒸留水にて洗浄した。その後、PBS（日水製薬社製ダルベッコPBS（-））水溶液を充填し、中空糸膜ミニモジュールを得た。

【0054】

ヒト血清（SIGMA社 H1388、Lot 28H8550）を3000rpm15分の条件にて遠心処理を行い濾液および沈殿物を取り除いた後0.45 μ mのフィルター処理を行った。中空糸膜ミニモジュールの透析液側の一方をキャップし、一方はシリコンチューブをつなぎ、ペリスターポンプに接続した。中空糸膜内側の液は入口と出口をシリコンチューブでつなぎ、ペリスターポンプを用いて血清を循環できるようにした。血清の循環流量5ml/min、濾過流量0.2mL/minの流速で20℃、4時間濾過を実施した（本工程は、主にアルブミンより大きいタンパク質を分画する工程に相当する）。この時濾過された容量分はPBSを血清に加えて循環する液量は一定に保った。4時間で得た濾液中のアルブミン濃度は61mg/L、 α 1-ミクログロブリン濃度は0.4mg/L、 β 2-ミクログロブリン濃度は0.066mg/Lであった。得られた濾液を使用したヒト血清中のアルブミン濃度に33000mg/Lまでザルトリウス社製vivaspin20（3000MWC0タイプ）を用いて濃縮したところ（本工程は、主にタンパク質を濃縮する工程に相当する）、 α 1-ミクログロブリン濃度は216.4mg/L、 β 2-ミクログロブリン濃度は35.7mg/Lであり、ヒト血清中の α 1-ミクログロブリン濃度は16.5mg/L、 β 2-ミクログロブリン濃度は1.17mg/Lに対して大幅に濃縮されていた。

【0055】

(実施例 2)

ポリスルホン（テイジンアモコ社製ユーデル（登録商標）P-3500）18重量部およびポリビニルピロリドン（BASF社製K30）9重量部をN、N'-ジメチルアセトアミド72重量部および水1重量部の混合溶媒に加え、90℃で14時間加熱して溶解し、製膜原液を得た。この製膜原液を外径0.3mm、内径0.2mmのオリフィス型二重円筒型口金の外側の管より吐出した。芯液としてN、N'-ジメチルアセトアミド58重量部および水42重量部からなる溶液を内側の管より吐出した。吐出された製膜原液は、乾式長350mmを通過した後、水100%の凝固浴に導かれ、中空糸が得られた。得られた中空糸を10000本、透析液入口および透析液出口を有する円筒状のプラスチックケースに挿入し、両端部を樹脂で封止して、有効膜面積1.6m²の人工腎臓用中空糸膜モジュール1を作成した。カチオン性親水性高分子としてポリエチレンイミン（BASF社製、重量平均分子量100万）0.1重量%を含む水溶液を、この中空糸膜モジュールの中空糸膜内面側および外面側に、それぞれ11000mL通液し、モジュール内を該水溶液で充填した。この後、該モジュールに γ 線照射した。 γ 線吸収線量は27kGyであった。該モジュールの中空糸を切り出し、100本束ね、中空糸中空部を閉塞しないようにエポキシ系ポッティング剤で両末端をガラス管モジュールケースに固定し、ミニモジュールを作成した。該ミニモジュールの直径は約7mm、長さは約17cmであり、一般的な中空糸膜型透析器同様に透析液ポートを2個有している。中空糸およびモジュール内部を蒸留水にて洗浄した。その後、PBS（日水製薬社製ダルベッコPBS（-））水溶液を充填し、ポリエチレンイミン固定化中空糸膜ミニモジュール（以降ミニモジュール2と略す）を得た。

【0056】

ヒト血清（SIGMA社、H1388、Lot 28H8550）を3000rpm、15分の条件にて遠心処理を行い濾液および沈殿物を取り除いた後0.45 μ mのフィルター処理を行った。まず、実施例1と同じ中空糸膜ミニモジュール（以降ミニモジュール1と略す）を準備し、透析液側の一方をキャップし、一方はシリコンチューブをつないだ。中空糸膜内側の液は入口と出口をシリコンチューブでつなぎ、ペリスターポンプを用いて血清を循環できるようにした。さらに、ミニモジュール2も透析液側の一方をキャップし、一方はシリコンチューブ

をつなぎ、ペリスターポンプに接続した。中空糸膜内側の液は入口と出口およびミニモジュールの透析液側をシリコンチューブでつなぎ、PBSを充填し、ペリスターポンプを用いて液を循環できるような、ミニモジュールが2段直列につながったシステムを作成した。ここで、ミニモジュール1がアルブミン以上の分子量のタンパク質を分画する工程、ミニモジュール2がアルブミン以上の分子量のタンパク質を吸着する工程と、アルブミン以上の分子量のタンパク質を分画する工程に相当する。

【0057】

血清およびミニモジュール2の循環液の循環流量5mL/min、濾過流量0.2mL/minの流速で20℃、4時間濾過を実施した。この時濾過された容量分はPBSを血清に加えて循環する液量は一定に保った。4時間で得た濾液中のアルブミン濃度は0.62mg/L、 α 1-ミクログロブリン濃度は0.036mg/L、 β 2-ミクログロブリン濃度は0.05mg/Lであった。得られた濾液を使用したヒト血清中のアルブミン濃度に33000mg/Lまでザルトリウス社製vivaspin20 (3000MWC0タイプ)を用いて濃縮したところ、 α 1-ミクログロブリン濃度は1916mg/L、 β 2-ミクログロブリン濃度は2661mg/Lであり、ヒト血清中の α 1-ミクログロブリン濃度は16.5mg/L、 β 2-ミクログロブリン濃度は1.17mg/Lに対して大幅に濃縮されていた。

【図面の簡単な説明】

【0058】

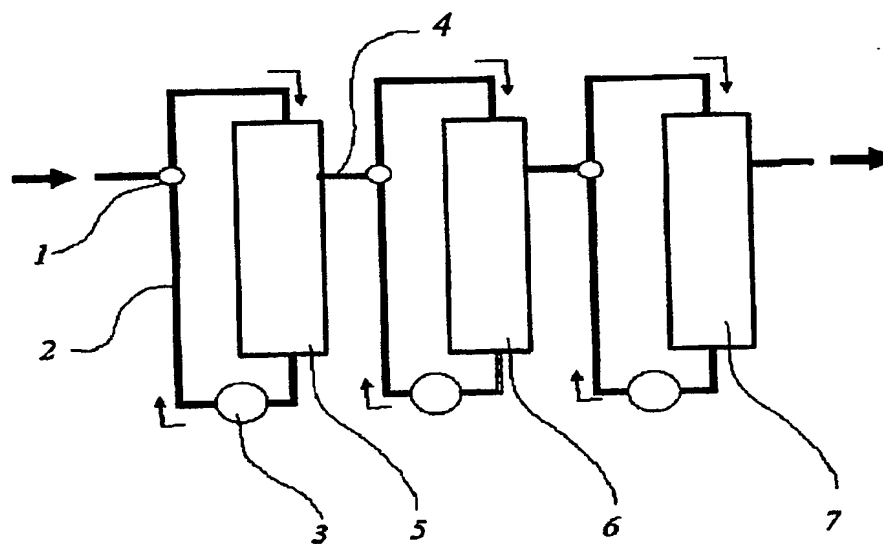
【図1】本発明のタンパク質分画装置の概念図である。

【符号の説明】

【0059】

- 1 バルブ
- 2 溶液循環回路 (チューブ回路)
- 3 ポンプ
- 4 処理液回収口
- 5 第1工程モジュール
- 6 第2工程モジュール
- 7 第3工程モジュール

【書類名】 図面
【図 1】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】 臨床プロテオーム解析をする際に、妨害となる過剰な高分子量のタンパク質を簡便かつ短時間で高い分離能で除去する方法ならびに装置。

【解決手段】 (I)分子量がアルブミン以上のタンパク質を吸着する工程、(II)分子量がアルブミン以上のタンパク質を分画する工程、(III) タンパク質を濃縮する工程、のうち (I), (II)あるいは (III)から選ばれる工程のうち少なくとも連結された2工程を組み合わせたり、各工程の膜にセルロース、ポリカーボネート、ポリスルホン、ポリメタクリレート、ナイロン、ポリエステル、ポリビニルのいずれかひとつの素材からなるフィルターあるいは中空糸を用いる生体成分含有水溶液中のタンパク質成分を分離する方法ならびにその装置。

【選択図】 図 1

特願 2 0 0 4 - 0 1 3 2 5 7

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 3 1 5 9]

1. 変更年月日

2 0 0 2 年 1 0 月 2 5 日

[変更理由]

住所変更

住 所

東京都中央区日本橋室町 2 丁目 2 番 1 号

氏 名

東レ株式会社